

19/08/930



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 29 402 A 1**

⑲ Aktenzeichen: 196 29 402.9
⑳ Anmeldetag: 20. 7. 96
㉑ Offenlegungstag: 5. 2. 98

⑤① Int. Cl.⁶:
A 01 H 5/00
A 01 H 1/00
C 12 N 15/82
C 12 N 15/87
C 12 P 1/00
A 01 H 1/02
B 09 C 1/00
C 02 F 3/32
// A23L 1/00, A23K
1/14

DE 196 29 402 A 1

⑦① Anmelder:
Voeste, Dirk, Dr., 44801 Bochum, DE

⑦④ Vertreter:
Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
50667 Köln

⑦② Erfinder:
Voeste, Dirk, Dr., 44892 Bochum, DE; Barth, Stefan,
Dr., 50674 Köln, DE; Andriske, Michael, Dr., 44801
Bochum, DE; Blüm, Volker, Dr., 44797 Bochum, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:
DE 41 33 920 C1

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verwendung von transformierten vaskulären Wasserpflanzen zur Produktion von arteigenen oder artfremden Substanzen

⑤⑦ Transformierte vaskuläre Wasserpflanzen erhältlich durch Transformation einer vaskulären Wasserpflanze mit genetischem Material in an sich bekannter Weise.

DE 196 29 402 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 12. 97 702 066/13

5/29

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind transformierte vaskuläre Wasserpflanzen, insbesondere solche der Gattung *Wolffia*, ein Verfahren zur Transformation von vaskulären Wasserpflanzen, ein Verfahren zur Kultivierung von transformierten Wasserpflanzen, ein Verfahren zur Herstellung von Substanzen mittels der erfindungsgemäßen transformierten Wasserpflanzen, ein Verfahren zur Kreuzung von transformierten Wasserpflanzen der erfindungsgemäßen Art sowie die Verwendung der erfindungsgemäßen transformierten vaskulären Wasserpflanzen.

Ein Ziel der industriellen Biotechnologie auf Basis der Molekularbiologie ist die Produktion von Substanzen, die durch Substanzen, die durch chemische Totalsynthese nur äußerst schwierig zu erhalten sind, wenn überhaupt. Dazu gehören insbesondere hochmolekulare, biologisch oder pharmakologisch wirksame Substanzen, wie beispielsweise Fette, Kohlenhydrate, Vitamine sowie Peptide oder Proteine, beispielsweise Antikörper, hochmolekulare, heterogene Konjugate und Fusionsproteine (z. B. Immunttoxine), aber auch niedermolekulare Substanzen. Durch gentechnologische Methoden können in der Regel genetisch veränderte Organismen hergestellt werden, die entweder in ihr Genom integrierte oder extrachromosomale, genetisch veränderte Information tragen. Als die üblicherweise in Betracht kommenden Systeme haben sich prokaryotische Zellen, insbesondere *E. coli*-Bakterien aber auch Hefen, die als nicht typische eukaryotische Zellen über einen komplexeren Stoffwechselapparat verfügen, etabliert.

Auch Pflanzen sind grundsätzlich genetisch veränderbar, jedoch hat sich die Pflanzen-Gentechnologie überwiegend auf die Beschleunigung von Züchtungsergebnissen konzentriert. Hierbei ist insbesondere die Einbringung von Resistenzgenen in Kulturpflanzen zu nennen, um diese Pflanzen beispielsweise gegen Krankheitserreger oder Herbizide resistent zu machen.

Pflanzen sind auch in biotechnologischen Anlagen gezüchtet worden, beispielsweise um die Biomasse dieser Pflanzen zu steigern. Dem Eingang von Pflanzen in komplexeren gentechnologischen Prozessen steht insbesondere als Hindernis entgegen, daß regelmäßig eine geringe Produktionsleistung der Stoffwechselprodukte negativ in Erscheinung tritt und Pflanzen sich regelmäßig nachteilig durch lange Generationszyklen und geringem Biomassezuwachs auszeichnen. Desweiteren ist nachteilig, daß gentechnisch veränderte Pflanzen kaum auf Akzeptanz bei Freilandversuchen stoßen. Eine Kultivierung von Pflanzen in geschlossenen Anlagen, wie beispielsweise Fermentern, ist jedoch nur äußerst selten möglich.

Nun ist es aber wünschenswert, den Syntheseapparat von Pflanzen auch der Gentechnik im engeren und weiteren Sinne zur Verfügung zu stellen, um mit Hilfe von Pflanzen komplexere Stoffwechselprodukte, insbesondere Biomoleküle, herzustellen, die sich insbesondere durch ihre Komplexität und/oder ihre Toxizität in anderen Expressionssystemen auszeichnen. Mithin besteht ein der Erfindung zugrundeliegendes technisches Problem darin, geeignete Pflanzen oder Pflanzensysteme für die Biotechnologie bereitzustellen. Die zu verwendenden Pflanzen sollen dabei in unproblematischer Weise züchtbar und der genetischen Transformation zugänglich sein.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem wird durch eine transformierte vaskuläre Wasser-

pflanze gelöst. Die Wasserpflanze ist erhältlich durch Transformation einer vaskulären Wasserpflanze mit genetischem Material, das für die gewünschte Substanz kodiert oder dessen Expression induziert und in die Wasserpflanze eingebracht werden kann. Erfindungsgemäß geeignet sind insbesondere Wasserpflanzen der Familie der Wasserlinsengewächse (*Lemnaceae*). Besonders bevorzugt ist hierbei die zur Gattung der *Wolffia* gehörende vaskuläre Wasserpflanze, besonders bevorzugt die Familie *Wolffia arrhiza*.

Die wurzellose Wasserpflanze *Wolffia arrhiza* (*L.*, Wasserlinse) gehört zu der Familie der *Lemnaceae* und gilt als die kleinste Blütenpflanze der Welt. Der Durchmesser der Blüten beträgt ca. 1 bis 1,5 mm. Die Pflanze kommt sowohl in tropischen wie auch in gemäßigten Klimabereichen vor und bildet dort auf Gewässern einen dichten "Pflanzenteppich". Neben der sexuellen Vermehrung spielt besonders die Vegetativvermehrung durch Knospung eine entscheidende Rolle für die Verbreitung dieser Art. Der hohe Biomassezuwachs, der mit *Wolffia arrhiza* verbunden ist, führt dazu, daß im asiatischen Raum in Teichen angezogene *Wolffia arrhiza* frühzeitig als Nahrungsmittel für Menschen und Tiere genutzt wurde. Für die Ernährung vorteilhaft war, daß sich der Protein- und Lipidgehalt von *Wolffia* mit den von herkömmlich angebauten Getreiden vergleichen läßt, wie Bhanthumnavin K. (1971), "Wolffia arrhiza as a possible source of inexpensive protein, *Nature* 232: 495 und Engst et al. (1991) in *Nahrung* 35: 695-710 beschrieben haben. Diese Ergebnisse verbunden mit dem kostengünstigen Anbau dieser Pflanzen führte dazu, daß die Wasserlinse als alternative Quelle für preiswertes Protein und Fett in den Mittelpunkt des Interesses rückte. So betrifft auch die DE 41 33 920 01 die Verwendung von *Lemnaceae* zur Herstellung eiweißarmer, pektinreicher zellstrukturierter Materialien mit großem Wasserbindevermögen.

In Biologie in unserer Zeit, 26. Jahrgang, 1996, Nr. 3, Seiten 187 ff. beschreiben K.-J. Appenroth und H. Augsten Wasserlinsen und ihre Nutzung.

Die Transformation der vaskulären Wasserpflanze erfolgt durch Verfahren, die es der Wasserpflanze ermöglichen, genetisches Material aufzunehmen. Es kommen hierzu insbesondere auch an sich bekannte Verfahren in Betracht. Vorzugsweise erfolgt die Transformation der vaskulären Wasserpflanzen zur *Agrobacterium* vermittelten Transformation, virale Infektion, Transformation nach PEG- oder Calciumchloridbehandlung, Elektroporation, Mikroinjektion, Liposomenfusion, Aufnahme freier DNA in Kokultur, Particle Bombardement, Glass-bead wounding und/oder laserinduzierte Transformation in Frage.

Die zur Transformation der Wasserpflanzen zu verwendenden Systeme sind nach dem Stand der Technik konstruierte Nukleotidstrukturen, die beispielsweise für Promotoren, Signalsequenzen, die erwünschten Zielsequenzen, Markergene und/oder ähnliche codieren. Die Expression kann verstärkt werden durch gegebenenfalls Kombination mit Silencer-, Enhancersequenzen und/oder Transkriptionsfaktoren und/oder Chaperonen, deren Expression aber auch durch Kultivierung unter definierten Bedingungen, beispielsweise unter Zusatz von Streßfaktoren (wie z. B. Hitze, Kälte, Salze, Alkohol) induziert werden kann.

Erfindungsgemäß erfolgt die Kultivierung der transformierten Wasserpflanzen in offenen oder geschlossenen Bioreaktoren. Hierbei kann in vorteilhafter Weise auch darauf zurückgegriffen werden, daß insbesondere

die Wasserlinse *Wolffia arrhiza* als Submers-Kultur gezüchtet werden kann. In einer alternativen Ausführungsform ist es jedoch auch möglich, diese Pflanzen in Aquarien, offenen oder geschlossenen Becken zu züchten. Eine etwas aufwendigere Behandlung verlangt die Anzüchtung der erfindungsgemäß transformierten Wasserpflanzen als Protoplastenkultur in wäßrigen Systemen und/oder in immobilisierter Form auf oder adsorbiert an oder auf Trägern. Sofern notwendig und möglich, kann die erfindungsgemäße transformierte Wasserpflanze auch als Kalluskultur sowie als Suspensionskultur isolierter Zellen oder auf Agar kultiviert werden. Die Auswahl der jeweiligen Kulturbedingungen richtet sich insbesondere nach den Bedürfnissen der Pflanzenkultur. Dabei kann zur Auswahl des geeigneten Kultivierungsverfahrens auch die Aufarbeitung der Pflanzen berücksichtigt werden, je nach dem, ob beispielsweise die Pflanzen die durch die Transformation zu synthetisierende Substanz in die Umgebung abgeben oder im Zellinneren akkumulieren. So kann es beispielsweise vorteilhaft sein, den durch die Transformation gebildeten Stoff in das Medium abgeben zu lassen, um dort kontinuierlich den interessierenden Stoff zu isolieren oder in der Pflanze anzureichern, um beispielsweise eine orale Applikation zu ermöglichen.

Die Kultivierung kann unterstützt werden, in dem die benötigten Nährstoffe der Wasserpflanze zugeführt werden. Dies ist in besonders vorteilhafter Weise in klassischen Zellkultursystemen aber auch in Kultursystemen, wie Fermentationsanlagen, möglich.

Vorteilhaft an der erfindungsgemäßen Verfahrensweise unter Verwendung von vaskulären Wasserpflanzen ist insbesondere die Tatsache, daß die Pflanzen sowohl sexuell, wie auch durch Protoplastenfusion gekreuzt werden können. Dies ist vorteilhaft, weil durch die freie und erleichterte Kombination rekombinanter Einzelstrukturen die Produktion komplexer Multidomän-Strukturen ermöglicht wird (Ma und Hein (1995), "Plant antibodies and immunotherapy", Plant Physiol. 109:341—346).

Die erfindungsgemäße Verwendung von transformierten vaskulären Wasserpflanzen zur gentechnischen Herstellung von Substanzen beruht darauf, daß auch kompliziertere Moleküle durch Expression von Genen in gentechnisch veränderten Organismen zugänglich werden. So können insbesondere mit dem erfindungsgemäßen System aus transformierten Wasserpflanzen rekombinante Immunttoxine hergestellt werden. Nach PCR-Amplifikation der variablen Domänen monoklonaler Antikörper werden diese über einen synthetischen Linker miteinander verbunden. Es entsteht ein einzelsträngiges variables Fragment (scFv), das ähnliche Affinität aufweisen kann, wie der parentale Antikörper. Diese Fragmente sind durch Einsatz von bakteriophagen Systemen herstellbar und beispielsweise durch Chain Shuffling humanisierbar. Es kommt insbesondere scFv in Betracht, die an Zellstrukturen zellulärer Oberflächen binden, die möglichst ausschließlich, oder in besonders hoher Anzahl (beispielsweise an bekannten Rezeptorstrukturen: CD25, CD30, CD40, CD80, GD2 usw.) auf bestimmten Zellen zu finden sind. Die Expression biologisch-aktiver, rekombinanter Fusionsproteine in *E. coli* ist häufig problematisch, da einerseits eine starke proteolytische Degradation und andererseits eine sehr niedrig effiziente Synthese zu verzeichnen ist. Die erfindungsgemäß zu verwendenden erfindungsgemäßen transformierten Wasserpflanzen schaffen hier Abhilfe.

Patentansprüche

1. Transformierte vaskuläre Wasserpflanzen erhältlich durch Transformation einer vaskulären Wasserpflanze mit genetischem Material in an sich bekannter Weise.
2. Transformierte vaskuläre Wasserpflanze nach Anspruch 1 die zur Familie der Wasserlinsengewächse (Lemnaceae) gehört.
3. Transformierte vaskuläre Wasserpflanze nach Anspruch 2 zur Gattung der *Wolffia* gehörend.
4. Transformierte vaskuläre Wasserpflanze nach Anspruch 3, mit der Bezeichnung *Wolffia arrhiza*.
5. Verfahren zur Transformation von vaskulären Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Wasserpflanzen nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4 transformiert werden durch ein Verfahren, das es der vaskulären Wasserpflanze ermöglicht, genetisches Material aufzunehmen.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Transformation erfolgt durch *Agrobacterium* vermittelte Transformation, virale Infektion, Transformation nach PEG- oder CaCl_2 -Behandlung, Elektroporation, Mikroinjektion, Liposomenfusion, Aufnahme freier DNA in Kokultur, Particle-Bombardement und/oder laserinduzierte Transformation, glass-bead wounding.
7. Verfahren zur Kultivierung von transformierten Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 in offenen oder geschlossenen Bioreaktoren, als Submerskultur, in Aquarien, offenen oder geschlossenen Becken, als Protoplastenkultur in wäßrigen Systemen und/oder immobilisiert auf oder an Trägern, als Kalluskultur, Suspensionskultur von isolierten Zellen oder auf Agar.
8. Verfahren zur Herstellung von arteigenen und artfremden Substanzen, wobei transformierte vaskuläre Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 kultiviert werden gemäß einem der Verfahren nach Anspruch 7.
9. Verfahren gemäß Anspruch 8 zur Isolierung von produzierten Substanzen entweder aus dem Kulturmedium oder aus den transformierten vaskulären Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 4.
10. Verfahren zur Kreuzung von transformierten Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei entweder eine sexuelle Kreuzung oder eine Protoplastenfusion durchgeführt wird.
11. Verwendung von transformierten vaskulären Wasserpflanzen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 zur gentechnischen Herstellung von Substanzen.
12. Verwendung gemäß Anspruch 11, wobei rekombinante Immunttoxine hergestellt werden.
13. Verwendung von transformierten vaskulären Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 als mögliche Nahrungsquelle für Mensch und Tier.
14. Verwendung von transformierten vaskulären Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 als als Zeigerorganismus oder Bioindikator zur Detektion von Stoffen, zum Beispiel toxischen, chemischen oder organischen Verbindungen oder Herbiziden.
15. Verwendung von transformierten vaskulären Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Dekontamination von Böden und Gewässern (beispielsweise Verbesserung der Nitrataufnahme, Wasserregeneration).